

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020020017754
(43)Date of publication of application: 07.03.2002 A

(21)Application number: 1020000051267
(22)Date of filing: 31.08.2000
(71)Applicant: DONG KOOK PHARM. CO., LTD.
KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY
(72)Inventor: JUNG, BONG HYEON
KANG, HYEON A
KO, SU MIN
LEE, SANG GI

(51)Int. Cl C12P 21/00

(54) TRANSFORMED YEAST PRODUCING RECOMBINANT HUMAN PARATHYROID HORMONE AND METHOD FOR PRODUCING THE HORMONE

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided are transformed yeast producing recombinant human parathyroid hormone(hPTH) and a method for producing the hormone effectively.

CONSTITUTION: The method comprises: producing the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* in which at least one of the gene YPS1, YPS2 and YPS3, encoding yapsin 1, yapsin 2 and yapsin 3 respectively, which belong to the yeast aspartic protease, is destroyed by using a yeast selection marker; transforming the mutant yeast strain with an expression vector, pG10-hPTH1, including hPTH gene; then culturing transformant, SLH16/pG10-hPTH (KCTC0815BP), to produce hPTH.

© KIPO 2002

Legal Status

Date of final disposal of an application (20030226)

Patent registration number (1003868360000)

Date of registration (20030526)

(19)대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. 7
C12P 21/00

(45) 공고일자 2003년06월09일
(11) 등록번호 10-0386836
(24) 등록일자 2003년05월26일

(21) 출원번호 10-2000-0051267
(22) 출원일자 2000년08월31일

(65) 공개번호 특2002-0017754
(43) 공개일자 2002년03월07일

(73) 특허권자 동국제약 주식회사
서울 강남구 대치3동 997-8

한국생명공학연구원
대전 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자 이상기
서울특별시광진구광장동극동빌라가동101호

강현아
대전광역시유성구신성동하나아파트102동1202호

정봉현
대전광역시서구월평동누리아파트113동607호

고수민
경기도평택시비전2동동아모란아파트103-1202

(74) 대리인 황이남
박형준

심사관 : 원종혁

(54) 재조합 인체 부갑상선 호르몬을 생산하는 형질전환효모 및재조합 인체 부갑상선 호르몬의 생산방법

요약

본 발명은 효모로부터 인체 부갑상선호르몬 (human parathyroid hormone; 이하 hPTH라 함)을 효율적으로 생산하는 방법에 관한 것으로서, 효모 아스파탁 프로테아제 계열의 앵신 1, 앵신 2와 앵신 3를 코딩하는 *YPS1*, *YPS2* 와 *YPS3* 유전자들이 파쇄된 효모 사카로마이세스 세레비지애 (*Sacharomyces cerevisiae*) 균주를 제작하고, 상기 균주를 숙주로 하는 형질전환체를 배양하여 hPTH의 분해를 극소화함으로써 완전한 형태의 재조합 hPTH를 고수율로 생산하는 방법에 관한 것이다.

대표도

도 3a

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 팝-아웃(pop-out)이 가능한 *URA3* 선별표지를 사용한 *YPS3* 유전자 파쇄용 카세트의 제작과정도.

도 2는 효모 사카로마이세스 세레비지에에서 *YPS3* 유전자를 파쇄하고 추후 *URA3* 선별표지를 회수하는 과정에 관한 설명도.

도 3은 사카로마이세스 세레비지에 2805 균주 배경에서 *YPS1* 또는 *YPS3* 유전자가 파쇄된 경우의 hPTH 분해 양상을 24시간 배양(3a)과 48시간 배양(3b) 후 SDS-PAGE로 비교 분석한 결과도.

M: Prestained protein molecular weight marker.

- 1: 사카로마이세스 세레비지에 2805
- 2: 사카로마이세스 세레비지에 2805/pG10-hPTH1
- 3: 사카로마이세스 세레비지에 2805/pG10-hPTH1
- 4: 사카로마이세스 세레비지에 SY28Y3/pG10-hPTH1
- 5: 사카로마이세스 세레비지에 SY28Y3/pG10-hPTH1
- 6: 사카로마이세스 세레비지에 SY28Y4/pG10-hPTH1
- 7: 사카로마이세스 세레비지에 SY28Y4/pG10-hPTH1

C: Authentic hPTH 1 μ g

I: 완전한 hPTH1(1-84)

d1: 절단된 hPTH(27-84)

d2: 절단된 hPTH(1-80)

도 4는 사카로마이세스 세레비지에 L3262 균주 배경에서 *YPS1*, *YPS2*, 또는 *YPS3* 세 유전자 중에서 두 종류의 유전자가 함께 파쇄된 경우 또는 모두 파쇄된 경우의 hPTH 분해양상을 24시간 배양(3a)과 48시간 배양(3b) 후 SDS-PAGE로 비교, 분석한 결과도.

M: Prestained protein molecular weight marker.

- 1: 사카로마이세스 세레비지에 L3262
- 2: 사카로마이세스 세레비지에 L3262/pG10-hPTH1
- 3: 사카로마이세스 세레비지에 L3262/pG10-hPTH1
- 4: 사카로마이세스 세레비지에 SLH15/pG10-hPTH1
- 5: 사카로마이세스 세레비지에 SLH15/pG10-hPTH1
- 6: 사카로마이세스 세레비지에 SLH16/pG10-hPTH1
- 7: 사카로마이세스 세레비지에 SLH16/pG10-hPTH1
- 8: 사카로마이세스 세레비지에 SLH17/pG10-hPTH1
- 9: 사카로마이세스 세레비지에 SLH17/pG10-hPTH1
- 10: 사카로마이세스 세레비지에 SLH18/pG10-hPTH1
- 11: 사카로마이세스 세레비지에 SLH18/pG10-hPTH1

C: Authentic hPTH 1 μ g

I: 완전한 hPTH1(1-84)

d1: 절단된 hPTH(27-84)

d2: 절단된 hPTH(1-80)

도 5는 사카로마이세스 세레비지에 L3262 균주 배경에서 *YPS1* 유전자만 파쇄된 변이주(5a), *YPS1*과 *YPS3* 두 유전자가 파쇄된 변이주, 또는 *YPS1*, *YPS2*, *YPS3* 세 유전자 모두가 파쇄된 변이주(5b)를 계속적인 갈락토즈 공급으로 고농도 배양을 유도한 경우 72시간 동안 배양하면서 고농도 배양 말기에 일어나는 hPTH 분해 양상을 SDS-PAGE로 비교, 분석한 결과도.

M: Prestained protein molecular weight marker.

- 1: 사카로마이세스 세레비지에 L3262
- 1) 2-7: 사카로마이세스 세레비지에 L3262/pG10-hPTH1
- 8-13: 사카로마이세스 세레비지에 SLH11/pG10-hPTH1
- 2) 2-7: 사카로마이세스 세레비지에 SLH16/pG10-hPTH1
- 8-13: 사카로마이세스 세레비지에 SLH18/pG10-hPTH1

C: Authentic hPTH 1 μ g

I: 완전한 hPTH1(1-84)

d1: 절단된 hPTH(27-84)

d2: 절단된 hPTH(1-80)

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 효모로부터 인체 부갑상선호르몬(human parathyroid hormone; 이하 hPTH라 함)을 효율적으로 생산하는 방법에 관한 것으로 보다 상세하게는 효모 아스파티크 프로테아제 계열의 앱신 1, 앱신 2와 앱신 3를 코딩하는 *YPS1*, *YPS2* 와 *YPS3* 유전자들이 파쇄된 효모 사카로마이세스 세레비시애(*Sacharomyces cerevisiae*) 균주를 제작하고, 상기 균주를 숙주로 하는 형질전환체를 배양하여 hPTH의 분해를 극소화함으로써 완전한 형태의 재조합 hPTH를 고수율로 생산하는 방법에 관한 것이다.

인체 부갑상선 호르몬(hPTH)은 인체의 부갑상선에서 생산되는 84개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 호르몬이다. hPTH는 신장과 뼈에서 칼슘의 항상성을 조절하여 신진대사와 골형성을 촉진시키는 생리활성을 지니고 있다. 현재 구미에서 골다공증 치료제로 주로 사용되고 있는 에스트로젠이나 칼시토닌은 골흡수를 저해하는 효과가 있는 반면에, hPTH는 골형성 촉진 활성을 갖고 있어 재조합 hPTH를 골다공증 치료제로 개발하기 위한 연구가 선진국의 우수제약사들을 중심으로 활발하게 진행되고 있다. 특히 현대사회가 점차로 노령화되면서 골다공증의 예방과 치료에 대한 관심이 고조되고 있어, 기존의 골다공증 치료제를 효과적으로 대체할 것으로 기대되는 hPTH를 재조합 단백질 생산기술을 이용하여 대량생산하고자 하는 개발연구가 본격적으로 수행되고 있다.

재조합 hPTH 대량생산을 위해 비교적 높은 발현율을 보이는 원핵 세포인 대장균을 숙주로 이용한 생산기술 개발이 국내외에서 시도되고 있으나, 대장균에서 생산된 재조합 단백질의 리폴딩(refolding) 및 분리정제 공정에 큰 어려움이 있다. 이에 반해 단세포 진핵세포인 효모는 고등생물과 매우 유사한 유전자 전사, 번역 시스템과 더불어 유사한 단백질 분비기관을 갖추고 있어 제대로 폴딩(folding)된 활성화된 단백질을 발현 분비시킬 수 있는 장점이 있다. 또한 효모는 평소 세포 밖으로 분비하는 단백질 수가 매우 적기 때문에 발현 단백질의 회수와 정제가 용이한 장점도 지니고 있다. 더욱이 전통효모 사카로마이세스 세레비시애는 인체에 대한 병원성이 없고 내독성을 생산하지 않는 GRAS(generally recognized as safe) 미생물로 인정되어 의약품 재조합 hPTH 단백질 생산숙주로 매우 유용할 것으로 기대되어 사카로마이세스 세레비시애를 숙주로 이용한 hPTH 발현시스템의 개발이 시도되었다. 그러나 재조합 hPTH 분비 생산을 위한 발현 숙주로서 효모 사카로마이세스 세레비시애가 지닌 여러 장점에도 불구하고, 효모 숙주자체의 단백질 분해효소에 의해 세포 밖으로 분비된 hPTH가 절단되어 완전한 크기의 hPTH 회수율이 적다는 점(Gabrielsen et al., Gene 90, 255(1990))에서 효모를 이용한 hPTH 생산시스템이 산업적으로 실용화되는 것이 제한되어 왔다. 지난 십여년간 효모 발현시스템에서 재조합 hPTH 절단문제를 해결하기 위한 많은 연구가 진행되어 왔다. hPTH 절단인 효모 골지체에 존재하는 단백질 분해효소인 KEX2의 인지부위와 일치하는 Arg-25와 Lys-26 사이에서 일어나기 때문에 KEX2에 의해 분해된다고 사료되어 hPTH의 26번째 아미노산인 라이신을 글루타민으로 치환하여 단백질 절단에 대해 저항성을 갖는 hPTH 변이체를 제조한 바 있다(Reppe et al., J. Biol. Chem. 266, 14198(1991)). 또한 리안등은 유전자 재조합 기술을 이용하여 효모 유비퀴틴(ubiquitin)유전자의 3'-말단에 hPTH 관련 단백질(human parathyroid hormone related protein)을 직접 연결하여 분해되지 않은 hPTH 관련 단백질을 제조한 바 있다(Rian et al., Eur. J. Biochem., 213, 641(1993)). 그러나 단백질 변이체는 일반적으로 새로운 의약품으로 간주되기 때문에 이의 안정성을 인정받기 위해서는 매우 어려운 과정이 요구되며 유전자 융합 기술의 사용은 예상되는 절단반응에 의해 융합부위가 반드시 제거되어야 하며 융합 부위의 추가로 인해 원하는 단백질의 수율이 상대적으로 낮아지는 단점이 있다.

이에 본 발명자들은 hPTH 단백질 변이체나 융합체를 이용하지 않고 hPTH 절단을 방지할 수 있는 기술을 개발하기 위한 연구를 수행하던 중 단지 고농도의 L-아르기닌(arginine)을 배양배지에 첨가하는 것에 의해 hPTH 절단을 상당한 정도로 방지할 수 있는 방법을 개발하였다(Chung and Park, Biotechnol Bioeng 57, 245 (1998)). 이처럼 배양배지에 첨가된 아르기닌에 의해 hPTH 분해가 상당히 방지된다는 사실은 세포내에 존재하는 단백질 분해효소인 Kex2p에 의해 hPTH가 절단되는 것이 아니고 세포 밖으로 분비되는 다른 단백질 분해효소에 의해 hPTH가 주로 분해됨을 시사한다. 따라서 본 발명자들은 KEX2처럼 하나 또는 한 쌍으로 되어 있는 염기성 아미노산들의 C-말단 부분 또는 중간 부분을 인지하여 절단할 수 있는 프로테아제이며 효모 세포질 막에 부착되어 있다고 알려진 효모 아스파티크 분해효소 Yap3p(Yeast aspartic protease 3)가 실질적으로 효모 배양액으로 분비된 hPTH를 절단하는 주된 단백질 분해효소일 것으로 추정하였다. 이같은 추론에 근거하여 본 발명자들은 *YAP3* 유전자가 파쇄된 효모 균주(*yap3 Δ*)를 제작하고 이를 이용하여 hPTH 생산시스템을 구축한 결과 플라스크 배양시 hPTH 분해가 80% 정도 방지되어 완전한 형태의 hPTH를 고수율로 생산할 수 있는 방법을 개발하였다(Kang et al., Appl Microbiol Biotechnol, 50, 187(1998); 대한민국특허 등록 제 0246932 호(12월 8일 1999년)). 그러나 비록 야생형 균주보다는 훨씬 월등한 hPTH 생산성을 보이지만, *yap3 Δ* 변이주에서도 발효조를 이용한 고농도 배양 말기에서는 hPTH의 분해가 상당히 진행됨이 관찰되어(Song and Chung, Process Biochem 35, 503(2000)), 배양말기에는 Yap3p 외에 다른 프로테아제에 의해서도 hPTH 절단이 일어남을 시사하였다. 효모 사카로마이세스 세레비시애의 경우, Yap3p와 매우 유사한 구조와 기능을 보이는 또 하나의 아스파티크 프로테아제로써 Mkc7p (Komano and Fuller, Proc Natl Acad Sci, USA, 92, 10752(1995))이 보고되어 있어서 본 발명자들은 이 두 유전자가 함께 파쇄된 효모 균주(*yap3 Δ / mkc7 Δ*)를 제작하여 배양말기의 hPTH 절단에 미치는 영향을 살펴보았지만 *yap3 Δ* 균주와 별 다른 차이가 관찰되지 않았다(Choi et al., J. Microbiol Biotechnol 9, 679(1999)). 이와 같은 결과는 Mkc7p 단백질 분해효소가 비록 Yap3p와 매우 높은 유사성(53% 동일성)을 보이며 Kex2p 단백질 분해효소 부재시 프로 알파 팩터(pro- α -mating factor) 공정에 관여하는 등 매우 유사한 기능도 지녔지만 hPTH 절단에는 크게 관여하지 않음을 의미한다.

최근 공개된 효모 사카로마이세스 세레비시애 게놈 정보 분석을 통하여 *YAP3* (최근에는 *YPS1* 으로 개명됨)와 유사한 유전자들을 검색한 결과 기존에 알려져 있는 *MKC7* (*YPS2* 로 개명됨), *PEP4*, *BARI* 외에도 아직 규명되지 않은 아스파티크 프로테아제를 코딩하고 있는 세 개의 신규 유전자들이 존재함이 보고되었다(Olsen et al., Biochem J 339,

407(1999)). 기존의 *YPS1* 과 *YPS2* 처럼 앱신(yapsin)계통의 아스파틱 단백질 분해효소를 코딩하고 있다고 추측되는 이들은 *YPS3*, *YPS6* 와 *YPS7* 으로 명명되었다. 이들 중 *YPS3* 은 *YPS1* 및 *YPS2* 와 50% 정도의 동일성을 보이는 반면, *YPS6* 와 *YPS7* 는 *BAR1* 및 *PEP4* 에 각기 35% 및 25% 정도의 동일성을 보이고 있다. *YPS3* 와 *YPS1* 의 유사성으로부터 본 발명자들은 *yps1* Δ (기존의 *yap3* Δ) 균주에서 배양말기에 일어나는 hPTH 분해는 앱신 3(yapsin 3)에 의해 진행될 가능성이 있다고 추정하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

상기와 같은 전제하에 본 발명의 목적은 앱신 프로테아제 유전자들을 파쇄함으로써 효모에서 일어나는 재조합 hPTH의 분해를 극소화함으로써 효모로부터 hPTH를 고효율로 분비·생산하는 발현시스템을 제공하는 것이다. 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들은 효모 앱신 프로테아제를 코딩하는 유전자들 중 *YPS1* 외에도 *YPS3* 유전자가 함께 파쇄된 효모 변이주(*yps1* Δ/*yps3* Δ)와 *YPS1*, *YPS2* 및 *YPS3* 세 유전자 모두가 파쇄된 효모 변이주(*yps1* Δ/*yps2* Δ/*yps3* Δ)를 개발하고 이들을 hPTH 발현 숙주 균주로 사용하여 재조합 사카로마이세스 세레비지에에서 분비되는 재조합 hPTH의 분해를 획기적으로 방지하는 방법을 제공한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 앱신계통의 단백질 분해효소 *YPS1*, *YPS2*, *YPS3*에서 선택된 적어도 하나가 결손된 효모균주를 숙주로 하여 재조합 인체 부갑상선 호르몬(hPTH)을 생산하는 방법을 포함한다.

상기 단백질 분해효소 앱신 1(이하 *YPS1*라 칭함), 앱신 2(이하 *YPS2*라 칭함), 앱신 3(이하 *YPS3*라 칭함)는 hPTH의 N 또는 C말단에 대한 분해효소로 작용하여 효모를 숙주로 하는 완전한 hPTH 생산을 어렵게 한다. 따라서 본 발명에서는 상기 *YPS1*, *YPS2*, *YPS3*에서 적어도 하나가 결실된 효모 변이주를 형질전환체의 숙주로 이용하는 hPTH 생산 수율이 향상된 신규한 생산방법을 포함한다.

본 발명에 의하면 상기 효소 중 *YPS1* 및 *YPS2*는 주로 hPTH를 생산하는 형질전환체의 배양초기에 작용하는 것으로 보이며, *YPS3*는 배양말기에 hPTH에 작용하는 것으로 사료된다. *yps1*Δ 변이주는 상기 *YPS1*이 결손된 것으로 배양 초기에 *YPS1*의 활성이 억제되지만 배양후기의 *YPS3*에 의한 분해작용을 피할 수는 없게 되므로 배양 후기에는 상기 *YPS3*에 의한 hPTH분해로 생산수율을 저하시키는 원인이 된다.

따라서 효모를 숙주로 하여 hPTH 생산시 배양전후에 생산수율을 보다 향상시킨다는 관점에서는 *YPS1*과 *YPS3*가 함께 결손된 *yps1*Δ *yps3*Δ 변이주가 본 발명의 실시예에 있어 바람직하며, 더욱 바람직하기로는 상기 *YPS1*, *YPS2*, *YPS3* 세 효소가 모두 결손된 변이주인 *yps1*Δ *yps2*Δ *yps3*Δ 를 숙주로 하여 hPTH를 생산하는 것이 좋다.

상기 단백질 분해효소의 결손은 *YPS1*, *YPS2*, *YPS3*에서 선택된 적어도 하나의 유전자를 효모선택표지를 사용하여 파쇄하는 과정을 포함한다.

효모선택표지는 특별한 한정을 요하지는 아니하나 바람직하기로는 팝-아웃(pop-out)이 가능한 것이면 어떠한 것도 본 발명의 실시예에 적합하다. 본 발명의 바람직한 실시예에는 *URA3* 선택표지를 사용한 카세트의 형태로 제공되는 방법이 예시되어 있다. 상기 효모선택표지를 함유한 카세트는 양말단에 *YPS1*, *YPS2*, *YPS3*의 N말단과 C말단 부위를 코딩하는 유전자 절편을 구비하도록 함으로써 효모의 게놈(genome)에 함유된 목적(target)이 되는 유전자 즉, *yps1*, *yps2*, *yps3* 에서 원하는 유전자와의 상동 재조합과정을 통해 대체삽입되는 과정에 의해 원하는 유전자를 파쇄하는 것이 가능하다. 상기 선택표지는 게놈내에 카세트가 삽입되어진 효모를 선별하기 위해 사용되기에 충분한 것이면 족하다. 이하 본 발명에서는 *URA3*선택표지로 파쇄된 *yps3*변이주는 *yps3::URA3*로 표시하기로 한다.

인체 부갑상선호르몬(hPTH)은 소정의 발현벡터에 함유된 재조합벡터의 형태로 효모에 제공되어진다. 발현벡터는 효모체내에서 발현가능한 유전자 발현수단과 조절수단을 구비하도록 하며 벡터의 선택 및 재조합벡터 제조과정은 당업자에게 자명한 사항으로 자세한 설명은 본 발명의 바람직한 실시예에서 언급하기로 한다.

본 발명의 형질전환체는 상기 재조합벡터를 *yps1*Δ *yps3*Δ 또는 *yps1* Δ *yps2*Δ *yps3*Δ 변이주를 숙주로 하여 형질전환하는 과정으로 제조된 것을 포함한다.

본 발명의 바람직한 실시예에서는 재조합벡터로서 pG10-hPTH1을 *yps1*Δ *yps3*Δ, *yps1*Δ *yps2*Δ *yps3*Δ 변이주인 사카로마이세스 세레비지에를 숙주로 형질전환시킨 SLH16/pG10-hPTH(KCTC 0815BP, 2000.7.6일자 생명공학연구소에 기탁), SLH18/pG10-hPTH(KCTC 0816BP, 2000.7.6일자 생명공학연구소에 기탁)을 개시한다.

이하 본 발명의 내용을 실시예를 통해 구체적으로 설명하기로 한다.

다만 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하는 것으로 되지는 아니한다.

실험균주 및 플라스미드

효모 사카로마이세스 세레비지에에서 hPTH를 발현하기 위한 벡터로는 GAL10 프로모터::ppL::hPTHdb전자::GAL7 터미네이터 순으로 구성된 hPTH 발현카세트를 지니고 있는 사카로 마이세스 세레비지에 2μm 플라스미드인 pG10-hPTH1(chung and park, Biotechnol Bioeng 57, 245(1998))를 사용하였다. 팝-아웃 가능한 *URA3*선택표지(*URA3::tc5*)카세트는 pTcUR3에서 유래된 1.8kb BamH I 절편을 사용하였다(kang et al., Appl Microbiol Biotechnol 53, 575~582(2000)). *YPS3* 유전자가 결손된 효모균주를 제작하기 위한 모균주로는 사카로마이세스 세레비지에 2805와 사카로 마이세스 세레비지에 L3262a를 사용하였다(kang et al., J Microbiol Biotechnol 8, 42~48(1998)). *YPS1* 유전자(종래의 *YAP3*), *YPS2* 유전자(종래의 *MKC7*) 또는 이 두유전자가 모두 결핍된 효모균주 SLH11(kang et al., Appl Microbiol Biotechnol 59, 187(1998)), SLH12과 SLH14(Choi et al., J Biosci Bioengin 89, 77(2000))를 사용하였다. 이들 효모균주들의 유전적 특징을 아래 표 1에 정리하였다.

<표 1> 본 발명에 사용된 사카로마이세스 세레비시에 효모 균주들

Strain	Description/Genotype
2805	a parental strain (<i>MAT a pep4::His3 prb-Δ 1.6R can1 his3-20 ura3-52</i>)
S28Y3	a <i>yps1</i> -disruptant of 2805 (<i>MAT a pep4::His3 prb-Δ 1.6R can1 his3-20 ura3-52 yps1::tc5</i>)
L3262	a parental strain (<i>MAT a ura3-52 leu2-3,112 his4-34</i>)
SLH11	a <i>yps1</i> -disruptant of L3262 (<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his4-34 yps1::LEU2</i>)
SLH12	a <i>yps2</i> -disruptant of L3262 (<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his4-34 yps2::LEU2</i>)
SLH14	a <i>yps3</i> -disruptant of L3262 (<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his4-34 yps1::HIS4 yps2::LEU2</i>)

배지조성 및 배양조건

URA3 선별표지를 사용한 *YPS3* 유전자 파쇄용 카세트 또는 hPTH 발현백터 pG10-hPTH1을 이용하여 효모 균주를 형질전환시킬 때는 유라실(uracil)만이 결핍된 합성 배지 SC-URA를 사용하였고, 확보된 *yps3::URA3* 변이주에서 *URA3* 선별표지를 다시 회수하기 위해서는 5-FOA (5-fluoroorotate)배지를 사용하였다(Adams et al., Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997). *GAL10* 프로모터에서 hPTH 발현을 유도하기 위해서는 YPDG(효모 추출물 1%, 박토 펩톤 2%, 포도당 1%, 갈락토스 1%) 배지에서 48시간동안 배양하였다.

<실시예 1> 엡신 3 유전자 *YPS3* 가 파쇄된 효모 변이주 제작

YPS3 유전자 파쇄(disruption)를 유도할 상동재조합에 필요한 *YPS3* 유전자의 N-말단과 C-말단 조각을 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)으로 제조하기 위하여 진뱅크(GenBank)에 공지된 사카로마이세스 세레비시에 *YPS3* 유전자의 염기서열에 근거하여 두 쌍의 프라이머(primer)를 제조하였다. 추후 유전자 조작작정이 용이하도록 N-말단 조각을 위한 프라이머 세트(5'-GAC GAATTC CAGAAACGT CTGAGTGGAG-3', 5'-GCA GGATCC GTACTCTACCGAATGCCG-3')에는 *Eco* RI와 *Bam* HI 제한효소 자리를 각 5'-말단(밀줄 친 부분)에 도입하였고 C-말단 프라이머 세트(5'-CGC GGATC C CTATGCAGACCAGTGTGG-3', 5'-CGC TCTAGA CTGCATGC AAGGTCTGAC-3')에는 *Bam* HI와 *Xba* I 제한효소 자리를 각 5'-말단(밀줄 친 부분)에 도입하였다. Premix (Bioneer, Korea)를 사용하여 PCR (Perkin Elmer GeneAmp PCR 2400 thermal cycler ; 95℃ 30 sec, 55℃ 30 sec, 72℃ 30 sec, 25 cycle)을 수행하여 사카로마이세스 세레비시에의 염색체 DNA로부터 *YPS3* 유전자의 N-말단(800 bp)과 C-말단(700 bp) 조각을 증폭하였다. *YPS3* N-말단 조각은 *Eco* RI/ *Bam* HI로, C-말단 조각은 *Bam* HI/ *Xba* I 제한효소들로 각각 처리하여 *Eco* RI/ *Xba* I로 절단된 pBluescript II KS(+) (Stratagen) 백터와 연결하였다. 상기 제작된 백터 pB-YPS3NC의 *YPS3* 유전자 말단조각 사이에 존재하는 *Bam* HI 제한효소 자리로 *URA3* 팝-아웃 선별표지를 도입하여 *YPS3* 유전자 파쇄를 위한 백터 pB- *yps3::URA3* : *tc5* 를 완성하였다(도 1).

상기 제작된 백터 pB- *yps3::URA3* : *tc5* 를 *Eco* RI/ *Xba* I로 처리한 후 사카로마이세스 세레비시에 2805, L3262a, SLH11 (*yps1* Δ), SLH12 (*yps2* Δ), 그리고 SLH14 (*yps1* Δ/ *yps2* Δ) 등 여러 균주들을 각각 형질전환시켜 SC-URA 선별배지에서 일차적으로 Ura + 형질전환체들을 선별하였다. PCR로 이들 Ura + 형질 전환체들의 *YPS3* 유전자 파쇄 여부를 확인한 후, *URA3* 선별표지를 회수하기 위해 선별된 *yps3::URA3* : *tc5* 형질전환체들을 5-FOA plate에 도말하여 *URA3* 유전자가 상동재조합을 통해 팝-아웃된 *yps3::tc5* 형질 전환체를 선별하였다(도 2). 최종적으로 제작된 *yps3* Δ 변이주들의 *YPS3* 유전자 파쇄 여부는 PCR로 각각 재확인하여 여러 다른 엡신 프로테아제 유전자 결손과 더불어 *YPS3* 유전자가 파쇄된 균주들인 S28Y4, SLH15, SLH16, SLH17, 그리고 SLH18 등을 확보하였다(표 2).

<표 2> 본 발명에서 제작한 *YPS3* 유전자가 결손된 효모 균주들

Strain	Description/Genotype
S28Y4	a <i>yps3</i> -disruptant of 2805 (<i>MAT a pep4::His3 prb-Δ 1.6R can1 his3-20 ura3-52 yps3::tc5</i>)
SLH15	a <i>yps3</i> -disruptant of L3262 (<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his4-34 yps3::tc5</i>)
SLH16	a <i>yps1/yps3</i> -double disruptant of L3262 (<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his4-34 yps1::LEU2 yps3::tc5</i>)
SLH17	a <i>yps2/yps3</i> -double disruptant of L3262 (<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his4-34 yps2::HIS4 yps3::tc5</i>)
SLH18	a <i>yps1/yps2/yps3</i> -triple disruptant of L3262 (<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his4-34 yps1::LEU2 yps2::HIS4 yps3::tc5</i>)

<실시예 2> hPTH 발현 재조합 효모 균주 제작 및 hPTH 발현 분석

사카로마이세스 세레비시에 2805와 L3262 야생형 균주, S28Y4와 SLH15 (*yps3* Δ), SLH16 (*yps1* Δ/ *yps3* Δ), SLH17 (*yps2* Δ/ *yps3* Δ), 그리고 SLH18 (*yps1* Δ/ *yps2* Δ/ *yps3* Δ) 변이주들에서 hPTH의 발현을 비교 분석하기 위하여, 발현 백터인 pG10- hPTH1으로 제조된 각각의 균주들을 형질전환 시킨 후 Ura + 로 전환된 형질전환체를 선별하여 hPTH 발현 재조합 효모 균주들을 제조하였다.

상기 효모 균주들을 액체 최소 선택 배지(아미노산 부재의 효모 질소 기질 0.67%, 포도당 2%, Casamino acid 0.5%)에 접종하여 30℃에서 24 시간 동안 전배양한 후 YPDG 배지(효모 추출물 1%, 박토 펩톤 2%, 포도당 1%, 갈락토스 1%)에 2%로 접종하여 30℃에서 48 시간 동안 배양하면서 24 시간(도 3a)과 48 시간 때(도 3b)에 각각 배양액을 수득하였다. 이어서 수득된 배양액 500 μ l를 5,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 배양 상층액과 균체를 회수하였다. 각 배양 상층액에 DOC (deoxycholic acid) 용액과 TCA (trichloroacetic acid) 용액을 배양액의 1/10 부피로 넣어 배지 내에 존재하는 단백질을 0℃에서 30 분 동안 침전시킨 후 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. 침전된 단백질에 잔존하는 TCA 용액을 제거하기 위하여 아세톤으로 세척한 후 용해 완충액 (12 mM 트리스-Cl, 2.88 mM 머캡토에탄올, 0.4% SDS, 0.02% 브로모페놀 블루) 25 μ l에 녹이고 100℃에서 5 분간 가열하여 배양액 단백질 분해를 수득하였다. 각 10 μ l의 배양액 단백질 분해를 0.75 mm 두께로 15% 폴리아크릴아미드 분리 젤 (separating gel : pH 8.8, 가로 10 cm, 세로 8 cm)에 로딩한 후 125 V, 25 mA로 1 시간 30 분 동안 전기영동하고 쿠마시 염색법으로 염색하였다. 도 3에서 보듯이 효모 사카로마이세스 세레비시에에서 분비발현되는 재조합 hPTH는 SDS-PAGE상에서 분리하여 완전한 형태의 i(1-84), N-말단이 절단된 형태의 d1 (27-84), C-말단이 절단된 형태의 d2 (1-80) 세 개의 밴드로 나타난다. i 밴드와 d1 밴드에 해당하는 단백질을 PVDF (polyvinylidene difluoride) 막에 전사한 후 Milligen/Bioscience 6000 단백질 시퀀서를 이용 N-말단 아미노산 분석을 하여, i 밴드 단백질의 N-말단 아미노산 서열은 Ser-Val-Ser-Glu-Ile로 d1 밴드 단백질의 N-말단 아미노산 서열은 Lys-Leu-Gln-Asp-Val로 나타난 결과로 보아 i 밴드에 해당하는 단백질은 완전한 형태의 hPTH (1-84)이며 d1 밴드에 해당하는 단백질은 N-말단 26개의 아미노산이 손실된 절단된 형태의 hPTH (27-84)임을 확인하였다. d2 밴드의 경우, 비록 완전한 형태의 hPTH보다 큰 14-kDa 단백질의 전기영동 패턴을 보이지만 HPLC, MALDI 매스 스펙트로메트리 (mass spectrometry), C-말단 아미노산 서열분석 결과에 의해 C-말단의 아미노산 4-5개가 절단된 형태의 hPTH (1-79, 80)이며 이들 C-말단이 절단된 hPTH의 이상한 전기영동 패턴은 C-말단의 제거에 의한 단백질 구조의 변화에 의한 것이라 추정된다는 보고가 있다 (Vad et al., Protein Expr. Purif. 13: 396-402 (1998)).

<실시예 3> 엡신 프로테아제 결손 변이주에서의 hPTH 발현 양상 비교

YPS1 및 *YPS3* 유전자 파쇄가 hPTH 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해, 형질전환되지 않은 야생형 사카로마이세스 세레비지에 균주 2805, 형질전환된 야생형 균주 2805/pG10-hPTH1, 형질전환된 *yps1* Δ 변이주 S28Y3/pG10-hPTH1, 형질전환된 *yps3* Δ 변이주 S28Y4/pG10-hPTH1에서 인체 부갑상선호르몬의 분해 양상을 SDS-PAGE상에서 비교하여 보았다. 도 3에서 보듯이 형질전환되지 않은 균주에서는 hPTH가 전혀 발현되지 않았으며 (줄 1), 형질전환된 야생형 균주 2805를 배양한 경우에는 발현된 hPTH 중 약 50% 이상이 절단된 d1 형태의 hPTH로 존재하였다 (줄 3과 4). *yps1* Δ 변이주 S28Y3의 경우 배양 24 시간에 수득된 hPTH 중 절단된 hPTH가 5% 이하이며 배양액으로 분리된 hPTH의 95% 이상이 완전한 형태의 hPTH로 존재하였으며, 48시간 배양 후에는 약 30-40% 정도의 절단된 d1 형태의 hPTH가 관찰되었다. *YPS3* 유전자만 파쇄된 균주 S28Y4의 경우 야생형 균주와 큰 차이없이 24 시간 배양 시에 이미 분리된 hPTH 중 약 50% 이상이 절단된 hPTH로 존재하였다.

상기 도 3의 결과는 배양초기에 관찰되는 hPTH 절단을 일으키는 주된 프로테아제는 엡신 1이며 배양 말기에는 엡신 1 이외에 다른 프로테아제가 hPTH를 절단함을 보여준다. 그런데 *YPS3* 유전자만 파쇄된 균주의 경우는 엡신 1의 활성으로 인해 배양초기에 이미 hPTH 절단이 상당히 진행됨으로써 별 다른 효과를 볼 수 없음을 시사한다. 따라서 *YPS3* 유전자 결손이 다른 엡신 유전자들 *YPS1* 및 *YPS2* 가 함께 결손된 경우 hPTH 절단에 미치는 영향을 살펴보기 위해서, 형질전환되지 않은 야생형 사카로마이세스 세레비지에 L3262를 대조구로 하고, 형질전환된 L3262/pG10-hPTH1, 형질전환된 *yps3* Δ 변이주 SLH15/pG10-hPTH1, 형질전환된 *yps1* Δ / *yps3* Δ 변이주 SLH16/pG10-hPTH1, 형질전환된 *yps2* Δ / *yps3* Δ 변이주 SLH17/pG10-hPTH1, 형질전환된 *yps1* Δ / *yps2* Δ / *yps3* Δ 변이주 SLH18/pG10-hPTH1 등 각각의 재조합 균주에서 hPTH 분해 양상을 비교 분석하였다 (도 4a: 24시간 배양 후, 도 4b: 48시간 배양 후). 도 4에서 보듯이 형질전환되지 않은 균주에서는 hPTH가 전혀 발현되지 않았고 (줄 1), 야생형 균주 (줄 2와 3)와 *YPS3* 가 파쇄된 균주 (줄 4와 5), 그리고 *YPS2* 와 *YPS3* 가 함께 파쇄된 균주 (줄 6과 7)의 경우 24 시간 배양 후에 발현된 hPTH 중 약 50% 이상이 N-말단이 절단된 d1 형태의 hPTH로 존재하였고 48 시간 배양 후에는 hPTH의 분해가 더욱 촉진되어 절단된 hPTH의 양이 더 증가하였다. 그 반면에 흥미롭게도 *YPS1* 과 *YPS3* 두 유전자가 함께 파쇄된 균주 (줄 6과 7)와 *YPS1*, *YPS2*, *YPS3* 세 유전자가 모두 함께 파쇄된 균주 (줄 10과 11)에서는 48 시간 배양 후에도 d1 형태의 N-말단이 절단된 형태의 hPTH가 전혀 나타나지 않았다. 또한 *YPS1* 과 *YPS3* 두 유전자가 함께 파쇄된 균주의 경우에는 d2 밴드가 발현된 hPTH 중 약 20%를 차지하는 반면 *YPS1*, *YPS2*, *YPS3* 세 개의 단백질 분해 효소가 동시에 파쇄된 균주의 경우 48시간 배양 후에도 d2 밴드도 거의 보이지 않고 완전한 형태의 hPTH (i 밴드)만이 관찰되었다. 이러한 결과는 야생형 효모 균주에서 보이던 hPTH 분해 문제를 *YPS1*, *YPS2*, *YPS3* 세 종류의 엡신 단백질 분해 효소 유전자가 파쇄된 변이주를 사용하므로써 거의 완벽하게 극복할 수 있음을 입증한다.

<실시예 4> 고농도 배양에서의 hPTH 분해 양상 분석

고농도 배양 말기에서 상기 제작된 엡신 프로테아제 결손 변이주에서 발현되는 hPTH의 분해여부를 확인하기 위해, 플라스크 배양에서 계속적으로 갈락토스를 공급해줌으로 발효조에서의 고농도 배양 상태를 모방하였다. YPDG 배지에서 24 시간 배양한 후 배지내의 갈락토스 농도가 2%가 되도록 24 시간 간격으로 갈락토스를 배지에 첨가하여 72 시간 동안 배양하여, 형질전환되지 않은 야생형 사카로마이세스 세레비지에 L3262를 대조구로 하고 형질전환된 L3262/pG10-hPTH1, 형질전환된 *yps1* Δ 변이주 SLH11/pG10-hPTH1, 형질전환된 *yps1* Δ / *yps3* Δ 변이주 SLH16/pG10-hPTH1, 그리고 형질전환된 *yps1* Δ / *yps2* Δ / *yps3* Δ 변이주 SLH18/pG10-hPTH1 등 각각의 재조합 균주에서 hPTH 분해 양상을 비교 분석하였다 (도 5a: L3262/pG10-hPTH1, SLH11/pG10-hPTH1, 도 5b: SLH16/pG10-hPTH1, SLH18/pG10-hPTH1).

도 5에서 보듯이 야생형 균주(젤 1, 줄 2-7)의 경우 이미 배양 24 시간만에 발현된 hPTH 중 약 50% 이상이 N-말단이 절단된 d1 형태의 hPTH로 존재하였다. 그 반면에 *yps1* Δ 변이주(젤 1, 줄 8-13)와 *yps1* Δ *yps3* Δ 변이주(젤 2, 줄 2-7)의 경우 배양 24 시간에서는 거의 hPTH 분해가 관찰되지 않았지만, 갈락토스 공급을 계속하면서 고농도 배양이 진행된 48 시간 때부터는 hPTH 분해가 현저하게 진행됨이 관찰되었다. 이와 대조로 *yps1* Δ *yps2* Δ *yps3* Δ 변이주(젤 2, 줄 8-13)에서는 72 시간 배양 후에도 d1 형태의 N-말단이 절단된 형태의 hPTH가 전혀 나타나지 않았고 완전한 형태의 hPTH (i 밴드) 생성량이 현저하게 증가됨이 관찰되었다. 또한 144 시간 배양 후에도 절단된 형태의 hPTH가 생성되지 않음을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 고농도 배양 말기에 보이던 hPTH 분해 문제를 *YPS1*, *YPS2*, *YPS3* 세 종류의 앱신 단백질 분해 효소 유전자가 파쇄된 변이주를 사용함으로써 완벽하게 극복할 수 있음을 명백하게 보여주고 있다.

발명의 효과

이상 설명한 바와 같이 본 발명은 단백질 분해효소 앱신 1(예전명; YPA3)과 앱신 3가 함께 결손된 효모균주(*yps1* Δ / *yps3* Δ) 또는 앱신 1, 앱신 2(예전명; MKC7)와 앱신 3가 함께 결손된 효모균주(*yps1* Δ / *yps2* Δ / *yps3* Δ)를 재조합 hPTH 생산 숙주로 이용하면 단백질 분해효소에 의한 hPTH의 절단을 극소화함으로써 완전한 형태의 인체 부갑상선 호르몬을 높은 수율로 분비, 생산할 수 있어 재조합 hPTH를 의약품으로 개발 가능하게 되므로 의약 산업상 매우 유용하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

효모균주를 숙주로 하여 재조합 인체 부갑상선호르몬(hPTH)을 생산하는 방법에 있어서, 앱신계통의 단백질 분해효소 *YPS1*, *YPS2*, *YPS3*에서 선택된 적어도 하나가 결손된 효모균주를 숙주로 하여 부갑상선 호르몬 유전자(hPTH)를 함유하는 발현벡터로 형질전환시켜 배양함으로써 hPTH를 생산함을 특징으로 하는 재조합 인체 부갑상선 호르몬의 생산방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 단백질 분해효소의 결손은 *YPS1*, *YPS2*, *YPS3*에서 선택된 적어도 하나의 유전자를 효모선택 표지를 사용하여 파쇄한 것임을 특징으로 하는 재조합 인체 부갑상선 호르몬의 생산방법.

청구항 3.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, *YPS1*과 *YPS3* 두 유전자가 동시에 파쇄된 효모변이주를 숙주로 한 것임을 특징으로 하는 재조합 인체 부갑상선 호르몬의 생산방법.

청구항 4.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, *YPS1*, *YPS2*, *YPS3* 세 유전자 모두가 동시에 파쇄된 효모변이주를 숙주로 한 것임을 특징으로 하는 재조합 인체 부갑상선 호르몬의 생산방법.

청구항 5.

효모 *yps1* Δ *yps3* Δ 변이주를 숙주로 하고 상기 숙주에 인체 부갑상선 호르몬 유전자(hPTH)를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 형질전환효모.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 상기 형질전환효모는 인체 부갑상선 호르몬 발현벡터 pG10-hPTH1으로 형질전환된 효모 사카로마이세스 세레비지에 SLH16/pG10-hPTH(KCTC 0815BP)임을 특징으로 하는 형질전환효모.

청구항 7.

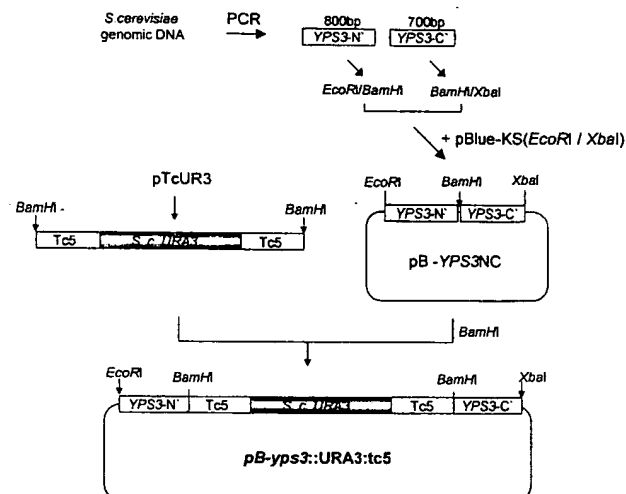
효모 *yps1* Δ *yps2* Δ *yps3* Δ 변이주를 숙주로 하고 상기 숙주에 인체 부갑상선 호르몬 유전자(hPTH)를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 형질전환효모.

청구항 8.

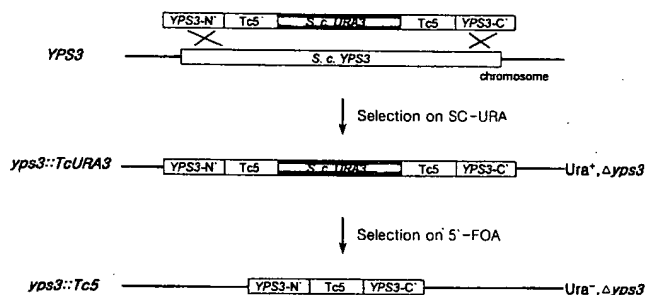
제 7항에 있어서, 상기 형질전환효모는 인체 부갑상선 호르몬 발현벡터 pG10-hPTH1으로 형질전환된 효모 사카로마이세스 세레비지에 SLH18/pG10-hPTH(KCTC 0816BP)임을 특징으로 하는 형질전환효모.

도면

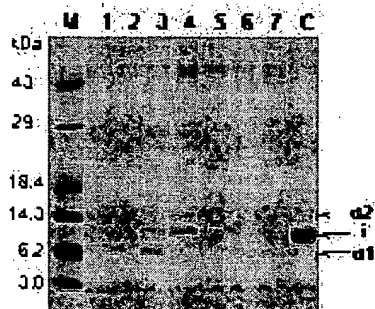
도면1



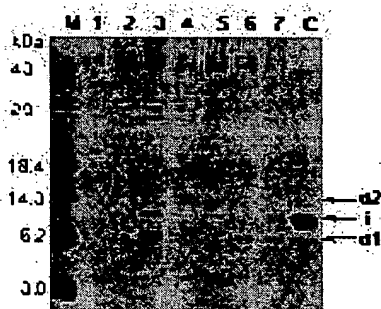
도면2



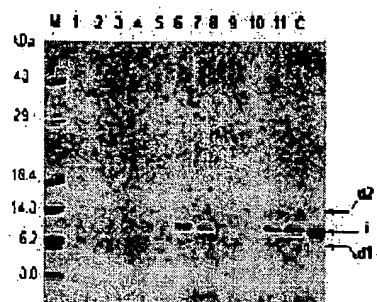
도면3a



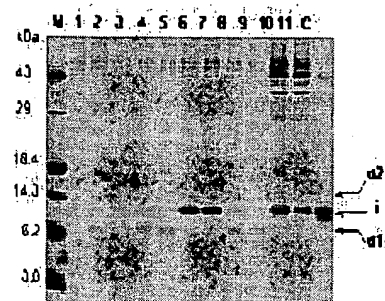
도면3b



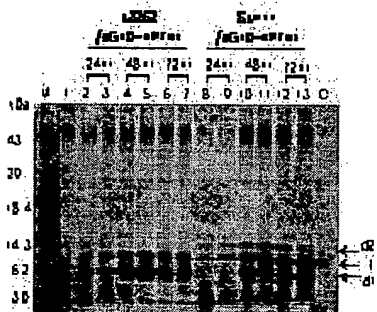
도면4a



도면4b



도면5a



도면5b

